

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

Jc872 U.S. PTO  
09/818583  
03/28/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2000年 4月27日

出願番号  
Application Number:

特願2000-127276

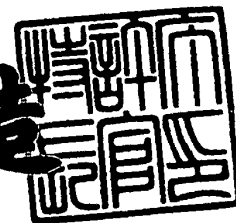
出願人  
Applicant(s):

株式会社島津製作所

2001年 1月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3112629

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1000145

【提出日】 平成12年 4月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明者】

    【住所又は居所】 京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社 島津製作  
所内

    【氏名】 外池 宏司

【特許出願人】

    【識別番号】 000001993

    【氏名又は名称】 株式会社 島津製作所

    【電話番号】 075-823-1111

【代理人】

    【識別番号】 100097892

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 西岡 義明

    【電話番号】 075-823-1415

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 005050

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸合成法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料から目的の核酸を増幅する核酸合成法において、生体由来試料を均質化した後、直接反応液に添加して核酸を増幅することを特徴とする核酸合成法。

【請求項 2】 界面活性剤を用いて試料を均質化することを特徴とする請求項 1 記載の核酸合成法。

【請求項 3】 界面活性剤がイオン性界面活性剤である請求項 2 記載の核酸合成法。

【請求項 4】 イオン性界面活性剤が陰イオン性界面活性剤である請求項 3 記載の核酸合成法。

【請求項 5】 陰イオン性界面活性剤がサルコシル、ドデシル硫酸塩（SDS等）である請求項 4 記載の核酸合成法。

【請求項 6】 均質化した試料を非イオン性界面活性剤を含む反応液で核酸合成することを特徴とする請求項 1 記載の核酸合成法。

【請求項 7】 非イオン性界面活性剤としてTween20 及び／又は Nonidet P40を用いることを特徴とする請求項 6 記載の核酸合成法。

【請求項 8】 生体由来試料を均質化して保存することを特徴とする試料の保存法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は核酸合成法、特に、ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction：以下PCRと略す）法による核酸合成法に関する。

【0002】

【従来の技術】

PCR法は、DNA鎖の1本鎖への解離、DNA鎖の特定の領域をはさんでプライマーの結合、DNAポリメラーゼの作用によるDNA合成反応を繰り返すこ

とによって、目的のDNA断片を数十万倍にも増幅できる方法である。PCR法は、マリス氏らの発明である特開昭61-274697号に述べられている。

#### 【0003】

PCR法は、種々の試料中の核酸の高感度分析法として使用可能で、特に動物体液由来試料中の核酸の分析法に使用できる。従って、PCR法は、感染症や遺伝病やガンの診断・モニタリング等に利用される。さらに、PCR法は移植や親子鑑定、個人の遺伝子情報に基づいた医療等でのDNAタイピングの検査にも適した方法である。これらの場合末梢血液が検査対象に選ばれる場合が多い。

#### 【0004】

PCR法の1つの欠点は色素、たんぱく、糖類あるいは未知の夾雑物によって反応が阻害されることである。すなわち、代表的な耐熱性DNAポリメラーゼである*Thermus aquaticus* 由来のTaq DNAポリメラーゼをはじめ、多くのDNAポリメラーゼは、微量の生体由来の夾雑物がPCR反応液中に混在しても、PCRが強く阻害されることが広く知られている。そこで、PCR法によるDNA増幅に先立って被験物から細胞、原虫、真菌、細菌、ウイルス等（以下、遺伝子包含体と称する）を分離し、次に、その遺伝子包含体から核酸を抽出する過程が必要となる。その方法としては、酵素、界面活性剤、カオトロピック剤等により遺伝子包含体を分解し、その後、フェノールあるいはフェノール・クロロホルム等を用いて、遺伝子包含体の分解物から核酸を抽出する方法が従来より使用されている。最近では核酸抽出の過程において、イオン交換樹脂、ガラスフィルターあるいはタンパク凝集作用を有する試薬が使用されている。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかし、これらの方法を用いて試料中の核酸の精製を行っても、不純物の完全な除去は困難であり、かつ、試料中の核酸の回収量が一定しない場合も多く、このため引き続く核酸合成が、とりわけ試料中の目的とする核酸の含量が少ない場合には、うまくできない場合もある。また、これら精製法は操作が煩雑で時間を要し、また操作中のコンタミネーションの機会が高い。従って、これらの問題点を解決するためには、より簡便で、かつ効果的な試料前処理法が望まれる。

## 【0006】

血液等の体液・尿等の液性の排泄物試料は静置しておくとその細胞・菌体成分等の固形成分が沈降し、目的とする核酸を含有する細胞・菌体等の不均一化が起こる。そのためそれら試料を用いて直接核酸増幅する時には試料添加前にあらかじめ攪拌操作を行い試料中の固形成分を均質に分布させる必要があった。

## 【0007】

遺伝子検査のための検査材料としては、末梢血液が用いられる場合が多い。我々は血液中の目的とする核酸を直接増幅できる核酸合成法を提供する方法をこれまでに考案してきた。しかし、全血試料は放置しておくとき血球・菌体成分等が沈降し、目的とする遺伝子を含有した血球・菌体等の不均一化が起こる。そのため血液試料を直接PCRするときには添加操作前にあらかじめ攪拌操作を行い均質に分布させる必要があった。また、体液および液性の排泄物試料を直接PCRに用いる時も同様の操作が必要であった。

## 【0008】

## 【課題を解決するための手段】

本件発明者は、界面活性剤で試料を処理しそのまま核酸合成の鑄型として保存・使用することを発明した。本発明は、特に血液等の体液および尿等の液性の排泄物そのものと核酸増幅反応液を混合し反応させる核酸合成法において、反応前に試料を界面活性剤で処理し、たとえば核酸を含む固形成分を破壊し、試料液中に均一に分散させる場合に有効である。また、これによって殺菌・殺ウイルス等の効果が期待され、生体試料を取り扱う時に懸念される作業者の生体試料からの感染の危険を低減することができる。

すなわち、本発明は、試料から目的の核酸を増幅する核酸合成法において、生体由来試料を均質化した後、直接反応液に添加して核酸を増幅することを特徴とする核酸合成法である。

ここで、「均質化」とは、核酸を試料液中に均一に分散させることをいう。また、「直接」とは、均質化以外の前処理が不要という意味である。

## 【0009】

均質化には、界面活性剤を用いるのが好ましい。界面活性剤には陰イオン性界

面活性剤・陽イオン性界面活性剤・両性界面活性剤・非イオン性界面活性剤がある。短時間内で核酸増幅に供する場合はこれらのどれを用いてもよい。陰イオン性界面活性剤、非イオン性界面活性剤の具体例は、後述するが、陽イオン性界面活性剤としては、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド等、両性界面活性剤としては、例えば、CHAPS、レシチン、リソレシチン、ホスファチジルエタノールアミン、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルフォネート等を用いることができる。

#### 【 0 0 1 0 】

しかし、時間経過とともに凝集物が出現し、核酸の試料液内での不均質化がおこる。それを解決するためさらに鋭意検討したところ陰イオン性界面活性剤を一定の濃度で使用することで凝集物が生じることを回避する事が出来た。例えば、血液試料をドデシル硫酸塩（以下総称としてSDSという）やサルコシル、デオキシコール酸ナトリウム、コール酸ナトリウム等の陰イオン性界面活性剤で処理することによって均質化をはかる。その際、試料を長期間安定的に均質状態で保存するためにはSDS・サルコシルの濃度は、試料液中に0.5%以上、好ましくは2%程度混入するのがよい。

#### 【 0 0 1 1 】

しかし、イオン性界面活性剤で処理した試料を通常使用されている標準的な反応液に直接添加してPCRを行っても、強い反応阻害が認められる。そこでさらに、この反応阻害を抑制する方法を鋭意検討したところ非イオン性の界面活性剤を反応に使用することによりこの反応阻害を抑制できることを見出した。非イオン性の界面活性剤としてはNonidet P40、Tween20、ジギトニン、n-ドデシルマルトシド、オクチルグリコシド、オクチルチオグリコシド、Triton X-100、ラウリル酸シュクロース、Tethit等が使用できるが、これに限定されるものではない。

使用するNonidet P40、Tween20は増幅反応液中にそれぞれ0.5%以上、好ましくは1から5%存在するのがよい。

非イオン性界面活性剤はイオン性界面活性剤で均質化した試料液と混合してから反応液に添加してもあらかじめ反応液に添加しておいてもよく、特に添加の順序を規定しない。

## 【 0 0 1 2 】

また、本発明による試料の均質化を行えば、試料の長期保存が可能となる。したがって、本発明は、生体由来試料を均質化して保存することを特徴とする試料の保存法をも提供する。保存期間は、試料の種類、均質化を行う界面活性剤の種類、濃度、保存条件などによっても変わるが、例えば、血液試料を陰イオン性界面活性剤で処理する場合は、室温においても数年間の保存が可能となる。

## 【 0 0 1 3 】

本発明において、試料は生体由来試料中の遺伝子包含体もしくは生体由来試料そのものをいい、生体由来試料とは、動植物組織、体液、排泄物等をいい、遺伝子包含体とは、細胞、原虫、真菌、細菌、ウィルス等をいう。体液には血液、髄液、乳、唾液が含まれ、排泄物には糞便、尿、汗が含まれ、細胞には血液中の白血球・血小板が含まれるが、これらに限定されるものではない。

## 【 0 0 1 4 】

核酸増幅反応液は、通常、pH緩衝液並びに $MgCl_2$ 、 $KCl$ 等の塩類、プライマー、デオキシリボヌクレオチド類及び核酸合成酵素を含むものである。また、上記の塩類は適宜他の塩類に変更して使用されている。また、ゼラチン、アルブミン等のタンパク、ジメチルスルホキシド等種々の物質が添加される場合がある。

pH緩衝液は、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンと塩酸、硝酸、硫酸等の鉱酸の組合せであり、鉱酸の中で望ましいものは塩酸である。また、トリシン、CAPSO（3-N-Cyclohexylamino -2 -hydroxypropanesulfonic acid）あるいはCHES（2-（Cyclohexylamino）ethanesulfonic acid）と苛性ソーダ、苛性カリとの組み合わせによるpH緩衝液等種々のpH緩衝液が使用され得る。pH調整された緩衝液は、核酸増幅反応液の中で10mMから100mMの間の濃度で使用される。

## 【 0 0 1 5 】

プライマーは、核酸と増幅用試薬等の存在下に合成の開始点として働くオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは一本鎖であることが望ましいが、二本鎖も使用できる。もし、プライマーが二本鎖の場合には、増幅反応に先立って一本鎖に

することが望ましい。プライマーは、公知の方法により合成することができるし、また、生物界から単離することもできる。

#### 【0016】

核酸合成酵素は、デオキシリボヌクレオチド類付加により核酸を合成する酵素、あるいはかような化学合成系を意味する。適切な核酸合成酵素としては、E. coliのDNAポリメラーゼI、E. coliのDNAポリメラーゼのクレノーフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、T. litoralis DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼそして逆転写酵素などがあるが、これらにのみ限定されるものではない。

#### 【0017】

また、本発明では核酸増幅反応液のpHを調節することにより、相乗効果が得られる。例えば、pHは、25℃の温度条件下で8.1以上、好ましくは8.5～9.5である。

また、本発明では、核酸増幅反応液にポリアミンを添加してもよい。

#### 【0018】

##### 【実施例】

##### [実験例1]

本例は、血液試料を終濃度2%のサルコシルで処理したものを直接添加PCRを行った実験である。試料はクエン酸処理ヒト血液を用いた。種々の血液濃度の溶解処理液2μlを直接PCR反応液に添加し(全50μl)、PCRを行った。

PCR反応液は、10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 各200μMのdATP, dCTP, dGTP及びdTTP, 2.5% Nonidet P40, 各0.4μMのprimer, 1.25 unitsのTaq DNAポリメラーゼ(TaKaRa Taq: Takara shuzo, Kyoto, Japan)を用いた。

なお、PCRのプライマーはヒトbeta-globin coding region内に位置するplus鎖の塩基配列を持つオリゴヌクレオチド(GH20: 配列番号1)及びminus鎖の塩基配列を持つオリゴヌクレオチド(GH21: 配列番号2)であり、PCRにより408bpの増幅産物を得ることができる(Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Science 239, 487-491.)。



GH20 : 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3'.

GH21 : 5' GGAAAATAGACCAATAGGCAG3'

#### 【0019】

PCRは、94℃、4.5分間のプレヒーティングの後、94℃ 1分間、55℃ 1分間、72℃ 1分間の条件で40サイクル、最後に72℃ 7分間のポリメライゼーションを行った。PCR終了後、反応液5 $\mu$ lを用いて、2.5%アガロースを含む、0.5 $\mu$ g/ml 臭化エチジウム添加TAE (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0) 液中で電気泳動を行い検出した。

#### 【0020】

溶解液で処理した試料を直接PCR反応液に添加し、PCRを行った時のPCR産物の電気泳動図を図1に示す。

図中Mは分子量マーカー、1は処理液中の血液含有量が1/2のもの、2は処理液中の血液含有量が1/4のもの、以下同様に3～12は血液量が2倍ずつ段階希釈された処理液を添加してPCRを行った結果を示す。なおNは血液不含の2%のサルコシル液を添加したものである。

図より、1～12で安定的かつ高感度に検出できることがわかる。

#### 【0021】

##### [実験例2]

本例は、血液試料を終濃度2%のサルコシルで処理したものを室温で10ヶ月間保存した後、直接添加PCRを行った実験である。試料はクエン酸処理ヒト血液を用いた。種々の血液濃度の溶解処理液2 $\mu$ lを直接PCR反応液に添加し(全50 $\mu$ l)、PCRを行った。反応に用いたPCR反応液の組成、PCRの条件、PCR後の電気泳動の条件は実験例1と同様である。電気泳動図を図2に示す。

#### 【0022】

図中Mは分子量マーカー、1は処理液中の血液含有量が1/2のもの、2は処理液中の血液含有量が1/4のもの、以下同様に3～12は血液量が2倍ずつ段階希釈された処理液を添加してPCRを行った結果を示す。なおNは血液不含の2%のサルコシル液を添加したものである。

図より、溶解処理後、長期間保存した場合でも図 1 の場合と同様に安定的かつ高感度に P C R 産物が検出できることがわかる。

【 0 0 2 3 】

なお、本実施例では非イオン性界面活性剤を用いているが、血液溶解処理液の P C R 反応液への添加量を減らすことで非イオン性界面活性剤非存在下でも安定的に P C R を行うことが可能であり必ずしも必須ではない。

【 0 0 2 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、反応前に試料を界面活性剤で処理し、核酸を含有する細胞・菌体等の固形成分を破壊し、試料液中に均一に分散させることができるので、試料をあらかじめ攪拌操作を行い試料中の固形成分を均質に分布させる必要がない。また、本発明によれば、試料の長期保存が可能となる。

【配列表】

<110>shimadzu corp.

<120>Method for synthesis of nucleic acids

<130>K1000145

<160>2

<210> 1

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400>1

gaagagccaaggacaggtac

<210>2

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<400> 2

ggaaaatagaccaataggcag

【図面の簡単な説明】

【図 1】

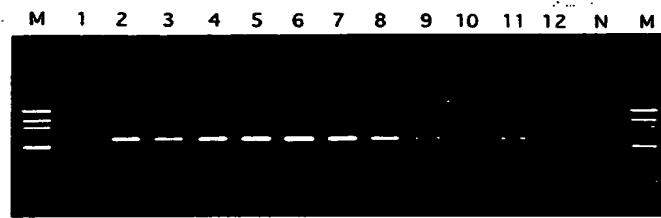
溶解液で処理した試料を直接 P C R 反応液に添加して、P C R を行ったときの  
増幅産物の電気泳動図

【図 2】

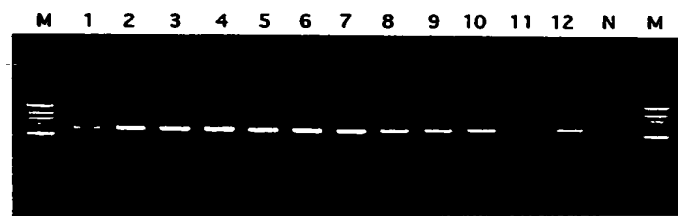
溶解液で処理した試料を長期保存した後、直接 P C R 反応液に添加して、P C  
R を行ったときの増幅産物の電気泳動図

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】本発明は、生体由来試料中に存在する目的とする核酸を精製操作なしで直接増幅出来る核酸合成法を行うのに有用な処理方法および保存方法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、生体由来試料そのものと核酸増幅反応液を混合し反応させる核酸合成法において、反応前に試料を界面活性剤で処理し、核酸を含有する細胞・菌体等の固形成分を破壊し、試料液中に均一に分散させることを特徴とする。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001993]

1. 変更年月日 1990年 8月27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地  
氏 名 株式会社島津製作所